

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：82405
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2013
 課題番号：23710023
 研究課題名（和文）湖沼における浮遊細菌を介した溶存有機物動態解明に向けた新たな展開
 研究課題名（英文）The relationship between dissolved organic matter cycling and bacterioplankton in freshwater environments

研究代表者

渡邊 圭司 (WATANABE KEIJI)
 埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・主任
 研究者番号：50575230

研究成果の概要（和文）：

湖沼および河川から、難培養および未培養系統群に属する浮遊細菌を多数分離・培養することに成功した。得られた浮遊細菌株は、炭素源として有機酸に強く依存していた。一部の浮遊細菌は、それらが生息する環境における主な有機酸の供給経路の違いにより（光分解もしくは一次生産のどちらの寄与が大きいか）、種レベルで棲み分けていた。また、浮遊細菌による陸域腐植様蛍光を有する溶存有機物の生成を確認した。本研究により、浮遊細菌を介した湖内炭素循環の一端が物質レベルで初めて明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded to the isolation of many of dominant but unculturable freshwater bacterioplankton clusters/subclusters from the freshwater lakes and a river. These isolates were strongly dependent on the carboxylic acids as carbon source. Freshwater bacterioplankton subclusters (PnecC and PnecD) have shown the niche separation by the difference of main source of carboxylic acids in the field (photodegradation of humic substances or primary production). In addition, the production of chromophoric dissolved organic matter which has terrestrial humic-like fluorescence by part of freshwater clusters/subclusters was observed in the cultivation experiments. The contribution of freshwater bacterioplankton to carbon cycle has been partly cleared due to the cultivation-based approach using pure strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境動態解析

キーワード：微生物ループ、物質循環、溶存有機物、浮遊細菌、湖沼環境

1. 研究開始当初の背景

我が国の湖沼やダム湖では、“流域負荷対策”が精力的に行われているにもかかわらず、有機物汚濁による水質悪化が依然問題となっている。特に水道水源となる湖沼等で溶存有機物が高濃度で残存する場合には、浄水場

の塩素処理滅菌過程でトリハロメタンが生じ、健康リスクの増大を引き起こす。有機物汚濁を改善するため、発生源対策のみならず、溶存有機物の湖内動態解明が求められている。

水圏環境中には、大きく分けて浮遊細菌と

付着細菌の2種類が存在しているが、溶存有機物の主な分解者は浮遊細菌と考えられている。浮遊細菌とは、水の中で浮遊もしくは漂流し基質上(固形物)に付着しないで自由生活している細菌の総称である。一方、付着細菌(懸濁態有機物、動植物プランクトンやデトリタスなどの固形物に付着している細菌の総称)は、主に懸濁態有機物の分解者であり、溶存有機物の分解に対する寄与は小さいと考えられている。よって、湖内溶存有機物の動態を考える上で、浮遊細菌による溶存有機物の取り込みおよび代謝産物としての新たな溶存有機物の生成機構を解明し、湖内溶存有機物プールへの寄与を見積ることは、重要な研究課題の一つである。

2. 研究の目的

湖沼の炭素循環において、浮遊細菌は溶存有機物の分解および新たな有機物の生産という点で重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、溶存有機物の何パーセントが浮遊細菌により取り込まれ、また新たな溶存有機物として排出されるのか、さらにはそれらの溶存有機物がどのような化学的特性を持つのかについては、その大部分が未解明である。本研究では、浮遊細菌を介した溶存有機物の流れおよび収支を、純粋分離株を用いた室内実験系により詳細に解明し、併せて実際の現場における浮遊細菌の現存量を明らかにすることで、湖内炭素循環における浮遊細菌の寄与を見積ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 浮遊細菌の純粋分離株の取得

予備試験において、試水を平均粒子保持径 $0.7\mu\text{m}$ のガラス繊維フィルターでろ過し、ろ液をグルコースおよび可溶性デンプンを除いて主な炭素源をピルビン酸とした MR2A 培地で培養する手法 (Size-exclusion assay method = SEAM) により、世界中に遍在することが知られているが未培養および難培養系統群に属する浮遊細菌の分離・培養に成功した。本研究では、日本の様々な湖沼および河川 (11 湖沼および 1 河川) に SEAM を適用し、さらなる未培養および難培養系統群に属する浮遊細菌の分離・培養を行い、研究材料となる純粋分離株の幅広い取得を目指した。

(2) 浮遊細菌の純粋分離株を用いた溶存有機物代謝機構の解明

得られた浮遊細菌の純粋分離株を用い、Biolog 社製のマイクロプレート (GP2、AN、GN2) による炭素源資化性試験を行い、浮遊細菌が利用可能な炭素源を調べた。次に、培地中の炭素源を 1 種類に固定し、窒素源を尿

素や無機栄養塩 (硝酸塩等) に替え、利用可能な窒素源の解明を行った。

(3) 湖沼における有機酸の供給経路の解明

炭素源資化性試験により、得られた浮遊細菌株は炭素源として有機酸に強く依存していることが明らかとなった。ここでは、有機酸の供給源として溶存有機物の光分解に着目し、溶存態画分 (平均粒子保持径 $0.1\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した霞ヶ浦および牛久沼の表層水) のろ液を石英試料ビンに入れ、屋外水槽を用いて太陽光による光分解を行った。一方で、微細藻類のクロレラ (*Chlorella sorokiniana* IAM C212) を光独立栄養条件下で培養し、培養後に遠心分離およびフィルターろ過処理を行った後、培地を回収した。生成した有機酸について、イオンクロマトグラフィー (分析カラムは IonPac AS17-C) による定性および定量分析を行った。

(4) 浮遊細菌による新たな溶存有機物の生成機構の解明

純粋分離株を用いた炭素源および窒素源資化性試験により得られた知見を基に、単一炭素源をピルビン酸、単一窒素源を尿素もしくは硝酸とし、微量金属 (リン酸カリウムおよび硫酸マグネシウム) を加えた最小培地を作成した。この最小培地を用いて、得られた代表的な系統群に属する浮遊細菌の純粋株を培養し、培地中に新たに生成した溶存有機物について、3次元励起蛍光スペクトル解析に供し、生成した溶存有機物の蛍光特性を調べた。

(5) 溶存有機物の質と関連した浮遊細菌の分布特性

SEAM は、特定の浮遊細菌種に対して極めて高い検出感度を示した。ここでは、富栄養湖、中栄養湖、貧栄養湖など日本の様々な栄養型の 11 湖沼および 1 河川を対象とし、SEAM による浮遊細菌の検出を行った。次に、検出された浮遊細菌種と環境パラメーター (溶存有機物の質など) との関連性を調べた。特に溶存有機物の質に関するパラメーターとして、腐植物質含量の簡便な指標である紫外外部吸光 (SUVA_{254}) および一次生産由来の溶存有機物の指標となる糖・アミノ酸含量に着目した。

(6) 主要浮遊細菌群の現存量推定

ここでは、世界各地の湖沼でその優占性および遍在性が報告されている *Polynucleobacter* 属細菌のサブクラスター C (PnecC) および D (PnecD) を対象とし、PnecC および PnecD に特異的な蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた検出法 (FISH 法) により、11 湖沼および 1 河川について PnecC

および PnecD の現存量を調べた。

4. 研究成果

(1) 浮遊細菌の純粋分離株の取得

日本の 11 湖沼および 1 河川より、世界中の湖沼に遍在および優占種として検出されるが（時として全細菌の 60%以上を占める）、これまで難培養もしくは未培養クラスターとして広く知られていた主要浮遊細菌群の分離および培養に成功した（表 1）。得られた浮遊細菌株は、予備実験と合わせ 350 菌株となった。これらは、11 のクラスターもしくはサブクラスターに帰属し、淡水圏に見られる浮遊細菌としては、現在世界トップクラスの株数および種数を誇っている。

表 1. 分離に成功した浮遊細菌

Freshwater cluster	Phylum/class	Strain no.
PnecA	Betaproteobacteria	2
PnecB	Betaproteobacteria	7
PnecC	Betaproteobacteria	130
PnecD	Betaproteobacteria	156
GKS98	Betaproteobacteria	15
Rhodoferrax sp. BAL47	Betaproteobacteria	16
LiUU-5-340	Betaproteobacteria	3
IRD18C08	Betaproteobacteria	26
GOBB3-C201	Alphaproteobacteria	3
Luna1	Actinobacteria	6
Luna2	Actinobacteria	19

(2) 浮遊細菌の純粋分離株を用いた溶存有機物代謝機構の解明

炭素源資化性試験より、得られた浮遊細菌株の大部分が、糖質およびアミノ酸には資化能を示さず、炭素源として有機酸に強く依存していることを明らかにした。一部の浮遊細菌は（主に *Actinobacteria* 門）、糖質への資化能を示し、系統分類群による資化性の違いも明らかとなった。本実験より、浮遊細菌を介した湖内炭素循環において、有機酸の生成（主な供給経路として溶存有機物の光分解および光合成生物からの一次生産が考えられる）および浮遊細菌によるそれらの取込み経路の重要性が示唆された。

(3) 湖沼における有機酸の供給経路の解明

湖水の溶存画分を石英ビンに入れ屋外で光分解を行ったところ、ギ酸や酢酸が μM のオーダーで生成することを明らかにした。一方で、微細藻類のクロレラを光独立栄養条件下で培養し、培地中に生成された有機酸を調べたところ、ピルビン酸が検出された。炭素源資化性試験より、分離された浮遊細菌の多くはギ酸、酢酸やピルビン酸に対する資化能を示したことから、浮遊細菌は、水圏環境中において溶存有機物の光分解により生成したギ酸や酢酸、藻類の光合成により供給されるピルビン酸等を主な栄養源として取り込んでいることが、実験的に示唆された。

(4) 浮遊細菌による新たな溶存有機物の生成機構の解明

単一炭素、単一窒素源および微量元素を含む最小培地を作成し、この液体培地でいくつか代表的なクラスター（サブクラスター）に属する浮遊細菌を培養し、培養後に培地中どのような溶存有機物が新たに生成されたのかを、3次元励起蛍光スペクトル解析で調べた。その結果、くつかの浮遊細菌株が陸域腐植様蛍光特性を有する新たな溶存有機物を生成していることが明らかとなった（図 1）。この結果は、浮遊細菌が腐植様難分解性溶存態有機物の発生源となり得る可能性を示唆していた。

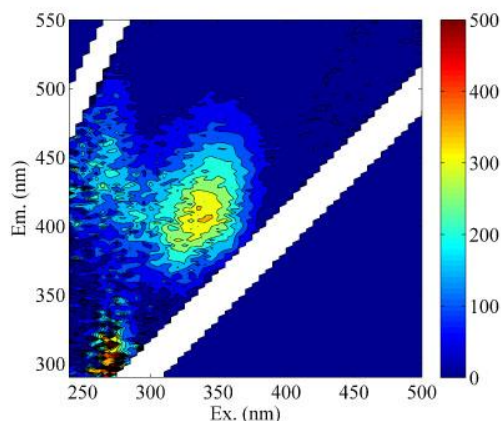


図 1. INA5 株培養液の 3 次元励起蛍光スペクトル

(5) 溶存有機物の質と関連した浮遊細菌の分布特性

SEAM により日本の様々な湖沼および河川を対象として浮遊細菌の分離・培養を行った。得られた浮遊細菌のうち *Polynucleobacter* 属の PnecC と PnecD の 2 種については、それらが生息する環境において主な有機酸の供給源として、腐植物質の光分解の寄与が強いのかもしくは植物プランクトンの一次生産の寄与が強いのかにより（溶存有機物の質の違い）、種レベルで棲み分けていることが明らかとなった。PnecC および PnecD は、栄養要求性が極めて類似しているため、栄養源を巡る競争を回避するために、このような生存戦略の違いを持つと推測された。

(6) 主要浮遊細菌群の現存量推定

FISH 法により、11 湖沼および 1 河川について PnecC と PnecD の現存量を調べたところ、DAPI で染色された全浮遊細菌に対し、それぞれ平均で 8.3% および 6.5% の値を示した。最大値は腐植栄養湖で検出され、PnecC および PnecD を合わせて全浮遊細菌の 35% にも達した（29% が PnecC）。以上の結果より、日本の湖沼においても、*Polynucleobacter* 属は優占種であることが初めて明らかとなった。

(7)まとめ

純粋分離株を用いてその生理生態を詳細に調べることで、これまでその実態が不明であった浮遊細菌を介した溶存有機物の取り込み分解および新たな溶存有機物の生成に関して、初めて物質レベルでその動態を明らかにすることができ、本研究の意義は大きい。また、得られた浮遊細菌の純粋分離株は、国内の微生物系統保存機関に寄託し、世界中の研究者が自由に使用できるよう整備した。今後の浮遊細菌研究において、重要な研究材料になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件) 査読有

①Watanabe K., Komatsu N., Kitamura T., Ishii Y., Park H-D., Miyata R., Noda N., Sekiguchi Y., Satou T., Watanabe M., Yamamura S., Imai A., Hayashi S.: Ecological niche separation in the *Polynucleobacter* subclusters linked to quality of dissolved organic matter: a demonstration using a high sensitivity cultivation-based approach. *Environmental Microbiolog*, Vol. 14, No.9, 2511 – 2525 (2012)

DOI:10.1111/j.1462-2920.2012.02815.x

〔学会発表〕(計3件)

①渡邊圭司：湖沼における主要浮遊細菌群の生態. 日本陸水学会, 2011年9月23日, 島根大学松江キャンパス.

②渡邊圭司：湖沼で優占する浮遊細菌群の生理生態的特徴. 日本微生物生態学会, 2011年10月8日, 京都大学北部キャンパス農学部総合館.

③Watanabe K.: Ecological niche separation in the *Polynucleobacter* subclusters linked to quality of dissolved organic matter, ASLO Aquatic Science Meeting, Lake Biwa, Shiga, Japan (2012.7.10).

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 圭司 (WATANABE KEIJI)

埼玉県環境科学国際センター・水環境担当・主任

研究者番号：50575230